

## ИССЛЕДОВАНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ В СКАНИРУЮЩЕМ ЭЛЕКТРОННОМ МИКРОСКОПЕ

Ю. С. Балашов

Средняя кишка и слюнные железы голодных и питающихся самок *H. asiaticum* после фиксации глутаровым альдегидом—осмием и обезвоживания методом критической точки были исследованы в сканирующем электронном микроскопе. Обнаружена хорошая сохраняемость поверхностных ультраструктур в широком температурно-временном диапазоне фиксации и обезвоживания.

В последние годы в паразитологии получают все большее распространение исследования целых животных или их отпрепарированных органов, поверхностей разных типов клеток и особенно их зон контактов с клетками хозяина с помощью разнообразных методик сканирующей (растровой) электронной микроскопии (СЭМ). Применение СЭМ значительно расширило представления о поверхностных ультраструктурах эндопаразитов, морфофункциональных особенностях их питания, взаимодействия с антителами и целыми клетками организма хозяина, локализации паразитов внутри клеток и тканей, иммунологических реакциях, пролиферации клеток и многих других морфофизиологических аспектах отношений в системах паразит-хозяин. Подобные исследования были выполнены главным образом на простейших и гельминтах. Изучение паразитических клещей и насекомых шло преимущественно по линии изучения их внешних кутикулярных структур (ротовые органы, сенсиллы, органы прикрепления и др.). Эти работы не требовали какой-либо специальной фиксации. Для напыления перед исследованием в СЭМ были пригодны сухие или сохранявшиеся в спирте и других консервантах объекты, а в некоторых случаях возможна работа даже с неповрежденными живыми клещами и насекомыми (Балашов, Миккау, 1977; Балашов, Леонович, 1984).

В изучении иксодовых клещей СЭМ успешно и в широких масштабах используется в систематике. Электронограммы целых клещей и их деталей во многих случаях заменяют приводимые в подобных работах графические изображения. В то же время из-за методических сложностей изучение в СЭМ мягких внутренних органов иксодид ограничивается единственной публикацией об ультраструктуре поверхности пищеварительных клеток клеща *Boophilus microplus* (Agbede, 1986). Анатомические и ультраструктурные особенности внутренних органов иксодид достаточно подробно описаны в литературе по данным световой и трансмиссивной электронной микроскопии (Балашов, 1979), но только с помощью СЭМ можно получить реальную картину распространения ранее выявленных структурных элементов на поверхности целого органа, восстановить истинные объемные соотношения ультраструктурных элементов и дать их полное топографическое описание.

Задача настоящей работы — дать оценку применимости общепринятых процедур подготовки мягких объектов для изучения в СЭМ к иксодовым клещам. Объектом работы были выбраны голодные и питающиеся самки *Hyalomma asiaticum* из лабораторной культуры, достаточно крупные размеры которых облегчали препаровку внутренних органов. Перед вскрытием живых особей охлаждали в течение 2 ч при температуре 4°, помещали в ванночку с дном из парафина с физиологическим раствором Рингера для паукообразных или 0.1 М фосфатным буфером, также охлажденными до 4°. Клещей закрепляли на дне ванночки энтомологическими минuciaми и удаляли у них кутикулу со спинной стороны идиосомы. После этого сразу же отпрепарировывали интересующие внутренние органы или их фрагменты и переносили для отмывания в охлажденный фосфатный буфер. Слюнные железы фиксировали целиком, а от средней кишки брали кусочки длиной до 4–6 мм. Фиксацию и проводку в ацетоне для обезвоживания проводили при 4-градусной или же при комнатной температуре. Для фиксации использовали 2.5 %-ный раствор глутаральдегида на 0.1 М фосфатном буфере, в котором объект выдерживали от 1 до 6 ч. Затем следовала промывка в 2 сменах фосфатного буфера и дофиксирование в 2 %-ной четырехокиси осмия в течение 1–4 ч. После промывки в фосфатном буфере проводили обезвоживание в серии ацетонов возрастающей крепости (30—50—70—90—100 %) и высушивали при критической точке в установке НСР-2 фирмы «Хитахи» (Япония). Обезвоженные и сухие объекты напыляли после закрепления их на столиках-держателях контактным клеем, платиной или золотом. Работу проводили на СЭМ модели S-450 фирмы «Хитахи» при увеличениях от 60 до 30 000.

Исследование препаратов, приготовленных на разных сроках и при различной температуре фиксации не выявили существенных различий в ультраструктуре поверхности клеток средней кишки, слюнных желез и других внутренних органов, включая их нитевидные и ламеллярные органеллы. Равным образом не влияло на сохранность внутренних органов вскрытие клещей в изотоничном физиологическом растворе или в 0.1 М фосфатном буфере. По-видимому, поверхностные ультраструктуры внутренних органов иксодовых клещей при обычной глутаральдегид-осмиевой фиксации достаточно хорошо сохраняют свои ультраструктурные особенности. Требования к температурному и временному режиму фиксации и проводки при подготовке объектов для СЭМ при этом оказались менее жесткими, чем в случае исследования тех же органов на ультратонких срезах в трансмиссионном электронном микроскопе. Не влияли на сохранность исследованных структур и сроки сохранения материала после фиксации в 70 и 90-градусном этиловом спирте, хотя в отдельных случаях они достигали 1–2 лет.

Наиболее массивным из внутренних органов иксодовых клещей является средний отдел кишечника, многочисленные трубчатые дивертикулы которого занимают большую часть полости тела. При изучении в СЭМ наружная поверхность дивертикулов на всем их протяжении выглядит одинаковой. Снаружи их покрывает тонкая пленка не клеточного материала, являющаяся производной рыхлой соединительной ткани. На этой пленке или под ней находятся отдельные соединительно-тканые клетки и только на ее поверхности — многочисленные гемоциты (рис. 1, 1, 2; см. вкл.).

Поверхность оболочки лишена собственного микрорельефа, и она повторяет очертания лежащей под ней мышечной оболочки. Последняя представляет густую сеть пересекающихся гладких мышечных волокон. Размеры петель этой сети зависят от степени растяжения дивертикулов пищей. Базальные концы пищеварительных клеток или небольшие участки из групп подобных клеток не выходят в полость тела сквозь мышечный слой независимо от степени растяжения стенок кишечника.

Внутренняя поверхность дивертикулов, как видно на разрезанных продольно и распластанных участках, имеет характерный неровный складчато-бугристый рельеф. Он создается вдающимися глубоко в полость кишки апикальными концами пищеварительных клеток. Высота последних и межклеточные пространства между соседними клетками увеличиваются по мере роста самих клеток на стадии питания. Кроме того, между и на поверхности пищеварительных клеток встречаются крупные свободные клетки сферической формы. Последние представляют отшнуровавшиеся в полость кишки крупные фрагменты пищеварительных клеток.

Поверхность пищеварительных клеток, направленная в кишечную полость, при малых и средних увеличениях (500—1500 раз) выглядит шероховатой (рис. 1, 3). При больших увеличениях (рис. 1, 4, 5) отчетливо различимы образующие подобный шероховатый ворс отдельные нитевидные микроворсинки. В частично разрушенных пищеварительных клетках питающихся особей на поверх-

ность выступают многочисленные сферические пузырьки. Они, вероятно, идентичны различным фаголизосомам, описанным ранее на ультратонких срезах (Балашов, 1979).

Хорошо сохраняются при использованной фиксации слюнные железы. В них хорошо различимы характерные для самок *Hyalomma asiaticum* 3 типа секреторных альвеол, отличающихся между собой по местоположению на выводных протоках железы и размерами (рис. 2, 1—3; см. вкл.). Во время питания прослеживается рост альвеол II и III типов, тогда как альвеолы I типа внешне не изменяются. У наиболее крупных альвеол III питающихся особей, сильно растянутых жидким содержимым, процедура фиксации не вызвала заметного сморщивания или разрывов стенок. Напротив, у закончивших питание клещей альвеолы слюнных желез обнаруживают признаки дегенерации (рис. 2, 4), отражающие процессы их естественного разрушения после выполнения ими физиологической функции.

На основании проделанной работы очевидно, что СЭМ может служить важным дополнением к другим методам изучения строения и функционирования внутренних органов иксодид. Его главное достоинство определяется возможностью выявления ультраструктурных изменений на целых органах, а не их изолированных фрагментах и в широком диапазоне увеличений. При этом подготовка материала для исследований в СЭМ существенно не отличается от таковой для приготовления ультратонких срезов. Вполне достаточна обычная глутаральдегид-осмиевая фиксация. Температурный и временной режим фиксации могут варьировать в значительных пределах без заметных повреждений поверхностей исследуемых объектов, как ранее было обнаружено для шистозом (Weisberg et al., 1983).

#### Л и т е р а т у р а

- Балашов Ю. С. (Ред.) Атлас электронно-микроскопической анатомии иксодовых клещей. Л., Наука, 1979. 256 с.  
Балашов Ю. С., Леонович С. А. Методы применения растровой электронной микроскопии в зоологии. Л., Наука, 1984. 70 с.  
Балашов Ю. С., Миккау Н. Е. Изучение живых животных в растровом электронном микроскопе. — Природа, 1977, № 1, с. 137—139.  
Agbede R. I. S. Scanning electron microscopy of diges cells in the midgut epithelium of *Boophilus microplus*. — Exp. Appl. Acorol., 1986, vol. 2, N 4, p. 329—335.  
Weisberg L. C., Carlisle A. S., Bentley A. J. Schistosome mansoni: Evaluation of preparative procedures for transmission and scanning electron microscopy. — J. Parasitol., 1983, vol. 69, N 2, p. 335—345.

ЗИН АН СССР, Ленинград

Поступила 22.03.1988

#### SCANNING ELECTRON MICROSCOPE STUDIES OF THE ULTRASTRUCTURE OF INTERNAL ORGANS OF IXODID TICKS

Ju. S. Balashov

#### S U M M A R Y

The structure of the surfaces of midgut and salivary glands in hungry and engorged females of *Hyalomma asiaticum* was studied by means of scanning electron microscopy. Preparations were fixed in glutaraldehyde osmium and then dehydrated by the critical point method and gold or platinum coating. Different periods of fixation at room temperature or at 4 °C did not affect the condition of surface structures of gut and salivary glands.

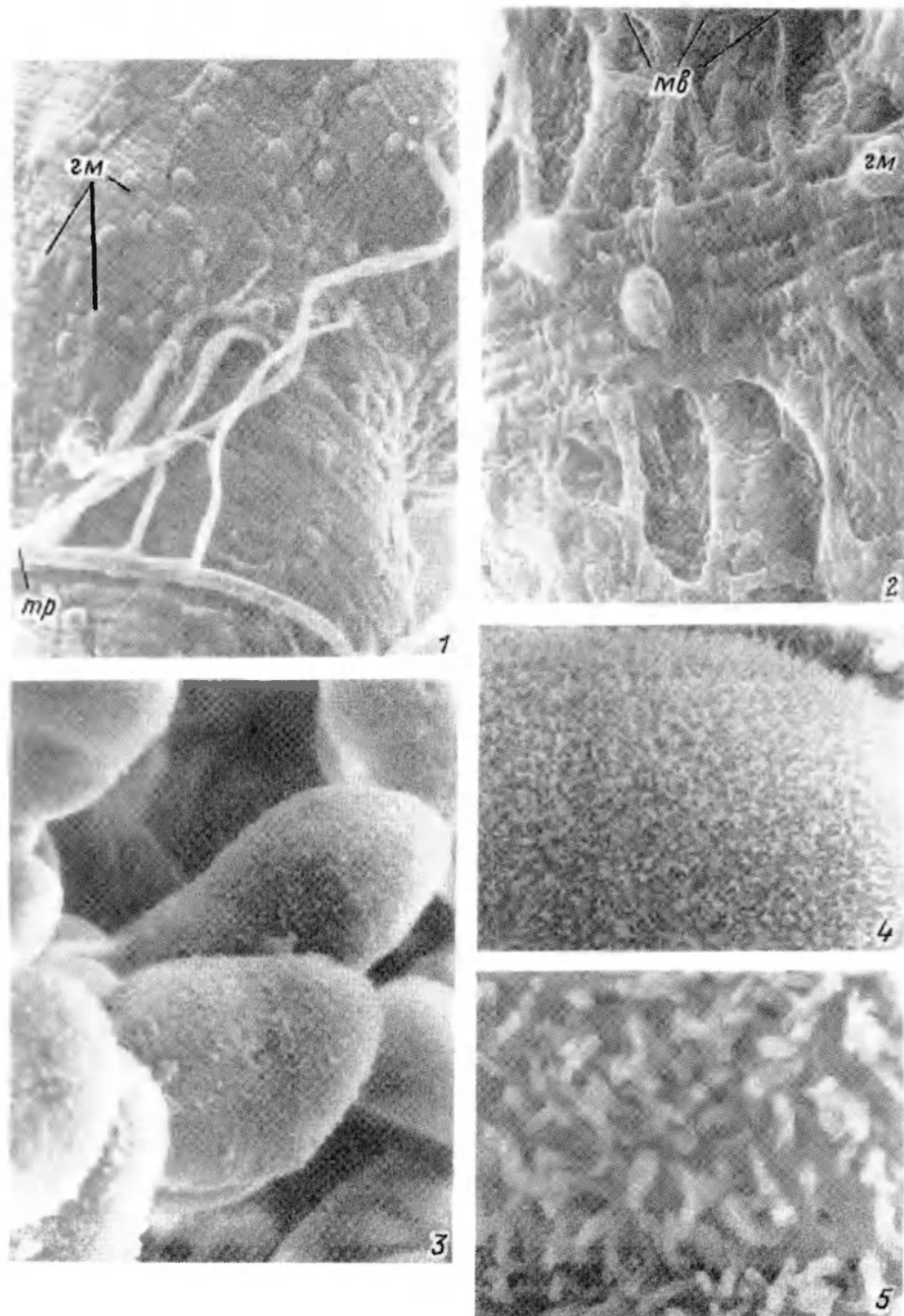


Рис. 1. Средняя кишка питающейся самки *Hyalomma asiaticum*.

1, 2 — наружная поверхность дивертикула средней кишки, 1 —  $\times 600$ ; 2 —  $\times 3000$ ; gm — гемоциты. mv — мышечные волокна, tr — трахеи; 3 — апикальные концы пищеварительных клеток ( $\times 1500$ ); 4 — их поверхность ( $\times 5000$ ). 5 — микроворсинки (мк) пищеварительных клеток,  $\times 30\,000$ .

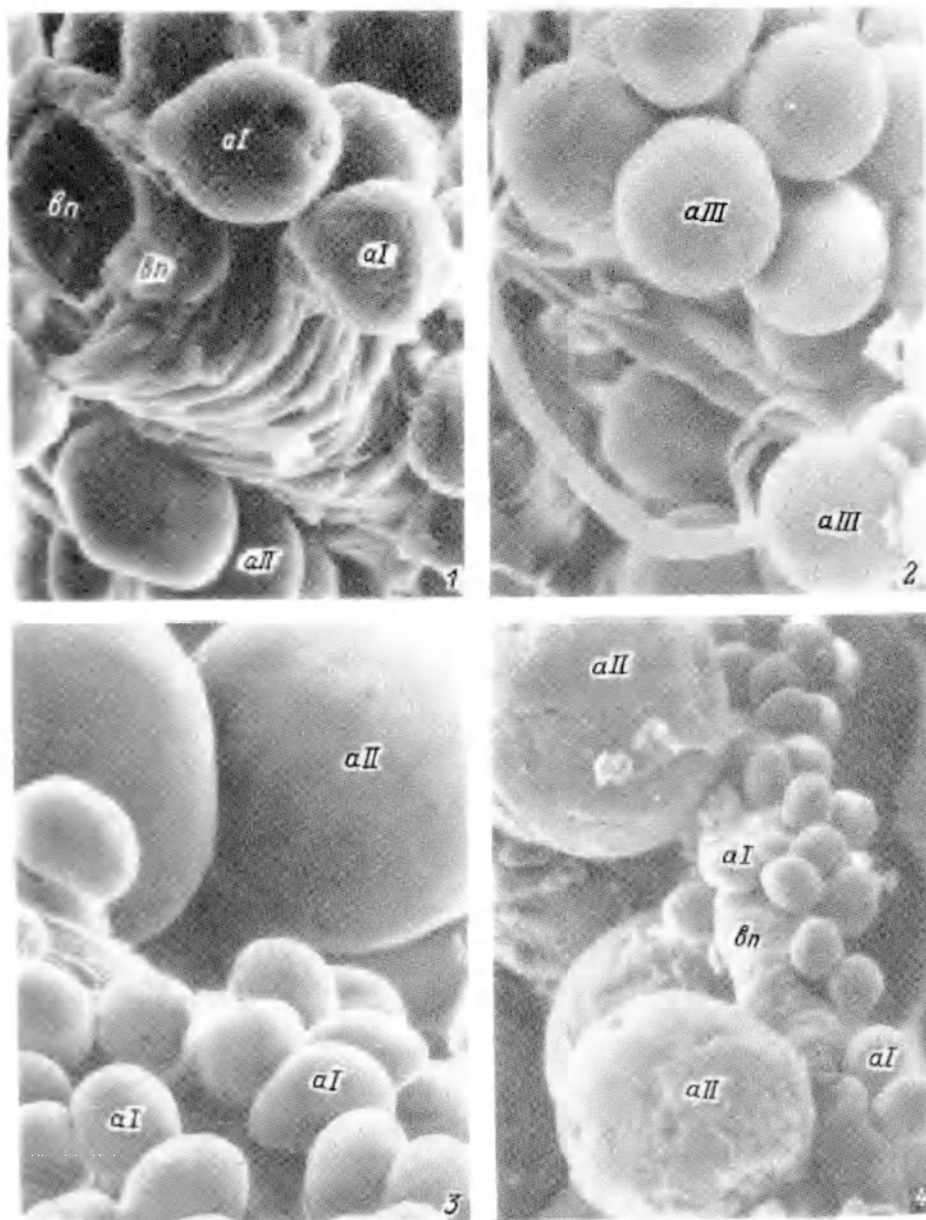


Рис. 2. Альвеолы слюнной железы самки *Hyalomma asiaticum*.

1 — альвеолы I (aI) и II типов (aII) на главном выводном протоке (вп), голодной особи,  $\times 1200$ ; 2, 3 — питающаяся особь, альвеолы I—III (aIII) типов,  $\times 1200$ ; 4 — альвеолы I и II типов закончившей питание особи,  $\times 700$ .